

Docket No. 248320US0



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Susumu KITANAKA, et al.

GAU:

SERIAL NO: 10/767,436

EXAMINER:

FILED: January 30, 2004

FOR: NOVEL DITERPEN COMPOUNDS

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS  
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e): Application No. Date Filed
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2003-201340	July 24, 2003

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
- are submitted herewith
  - will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.  
Norman F. Oblon



Frederick D. Vastne  
Registration No. 27,013



Vincent K. Shier, Ph. D.  
Registration Number 50,552

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 05/03)

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2003年 7月 24日

出願番号 Application Number: 特願 2003-201340

[ST. 10/C]: [JP 2003-201340]

願人 Applicant(s): 学校法人日本大学

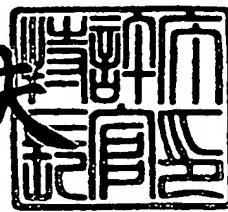
COPY

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2004年 2月 10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井 康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2004-3008351

【書類名】 特許願  
【整理番号】 Y1K0562  
【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願  
【提出日】 平成15年 7月24日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8番24号 学校法人日本大学内  
【氏名】 北中 進  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8番24号 学校法人日本大学内  
【氏名】 宮田 昇平  
【発明者】  
【住所又は居所】 中華人民共和国瀋陽市文化路103号 瀋陽薬科大学内  
【氏名】 王 立岩  
【発明者】  
【住所又は居所】 中華人民共和国広東省深△せん▽市高新技术産業園南區  
深△せん▽精華大學研究院C區7樓710室 深△せん▽中药及天然药物研究中心  
【氏名】 王 乃利  
【発明者】  
【住所又は居所】 中華人民共和国広東省深△せん▽市高新技术産業園南區  
深△せん▽精華大學研究院C區7樓710室 深△せん▽中药及天然药物研究中心  
【氏名】 姚 新生

COPY

## 【特許出願人】

【識別番号】 899000057

【氏名又は名称】 学校法人日本大学

## 【代理人】

【識別番号】 100059959

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 稔

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100067013

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 文昭

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100082005

【弁理士】

【氏名又は名称】 熊倉 穎男

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100065189

【弁理士】

【氏名又は名称】 宮戸 嘉一

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100074228

【弁理士】

【氏名又は名称】 今城 俊夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100084009

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 信夫

COPY

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100082821

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 村社 厚夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100086771

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 西島 孝喜

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100084663

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 箱田 篤

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100114007

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 平山 孝二

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008604

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

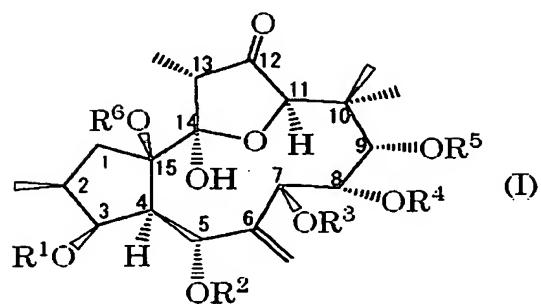
COPY

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なジテルペン化合物

【特許請求の範囲】

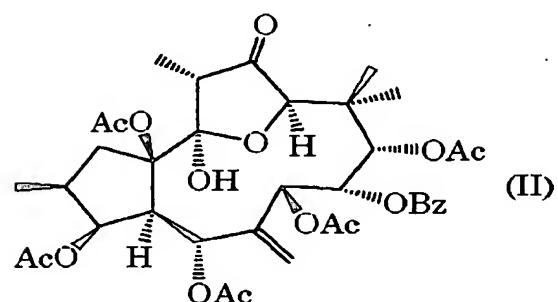
【請求項 1】 以下の一般式 (I) で表されるジテルペン化合物：



式中、

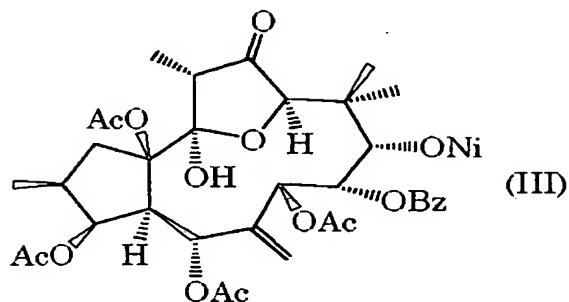
$R^1$ ないし $R^6$ は、同一又は異なっていてもよく、水素原子、直鎖若しくは分岐した、飽和若しくは不飽和の、置換若しくは未置換の脂肪族基、又は一般式 $R-CO-$ で表される基を意味し、式中 $R$ は直鎖若しくは分岐した、飽和若しくは不飽和の、置換若しくは未置換の脂肪族基、置換又は未置換の芳香族基又はヘテロ芳香族基を表す。

【請求項 2】 以下の式 (II) で表される、請求項 1 に記載のジテルペン化合物：

式中、 $A_c$  はアセチル基を、 $B_z$  はベンゾイル基を表す。

COPY

【請求項3】 以下の式（III）で表される、請求項1に記載のジテルペン化合物：



式中、A<sub>c</sub>はアセチル基を、B<sub>z</sub>はベンゾイル基を、N<sub>i</sub>はニコチノイル基を表す。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、抗悪性腫瘍剤として有用な、甘遂から単離された新規なジテルペン化合物に関する。

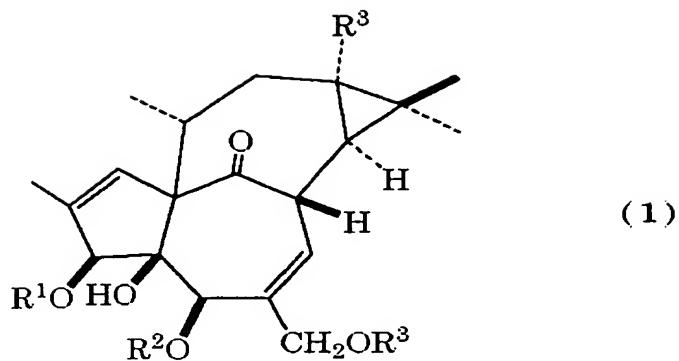
##### 【0002】

##### 【従来の技術】

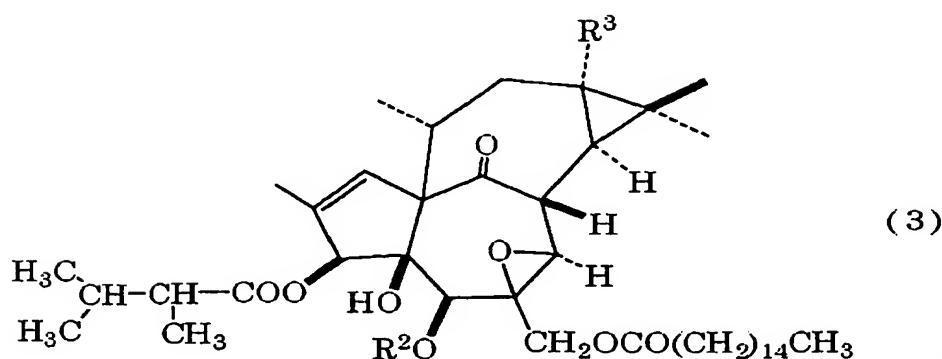
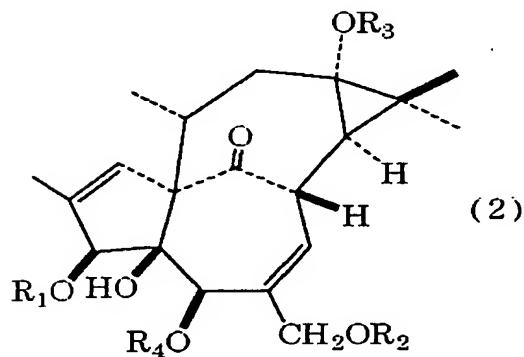
甘遂（学名：Euphorbia kansui L.）は、トウダイグサ科の多年生の植物で、中国北西部に分布する。中国では甘遂を慢性気管支炎、気管支喘息等のアレルギー疾患の治療に使用するほか、食道癌、乳腺癌などの悪性腫瘍の治療にも用いている。甘遂の成分研究は1943年頃から始められ、現在までに十数種類のジテルペン及びトリテルペンが見出されている。これらの成分のうちジテルペン化合物のいくつかに抗癌作用、抗ウィルス作用、細胞毒性作用があることが見出され、注目されている。

カブチャン（S. M. Kupchan）らは、Euphorbia esula L. から抽出した下記の式（1）のインゲノール誘導体がマウスにおけるP-388リンパ性白血病に対する活性を有することを示している（非特許文献1）。

COPY

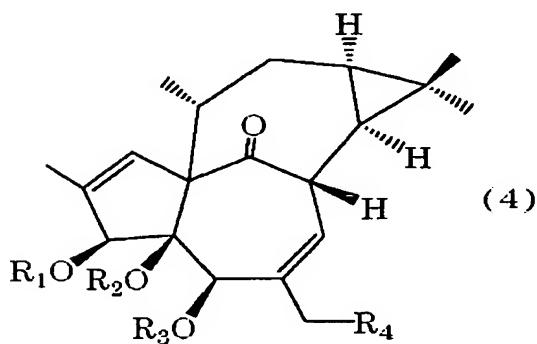


ウー (Tian-Shung Wu) らは、甘遂 (Euphorbia kansui L.) の根から抽出したカンスイホリンA (下記の式(2)) 及びカンスイホリンB (下記の式(3))が、インビボ (P-388) アッセイにより、活性を有することを示している (非特許文献2)。



COPY

ブランコーモリナ (Magdalena Blanco-Molina) らは、以下の式 (4) のインゲノール誘導体がジュルカト (Jurkat) 細胞にアポトーシスを誘導することを記載している (非特許文献 3)。



しかしながら、いずれも本発明の化合物を開示していない。

#### 【0003】

#### 【非特許文献 1】

S. Morris Kupchan, et. al., Science, Vol. 191, pp. 571-572, 13, Feb., 1976

#### 【非特許文献 2】

Tian-Shung Wu, et. al., J. Nat. Prod., Vol. 54, No. 3, pp. 823-829, 1991

#### 【非特許文献 3】

Magdalena Blanco-Molina, et. al., Chemistry & Biology, 8/8, pp. 767-778, 2001

#### 【0004】

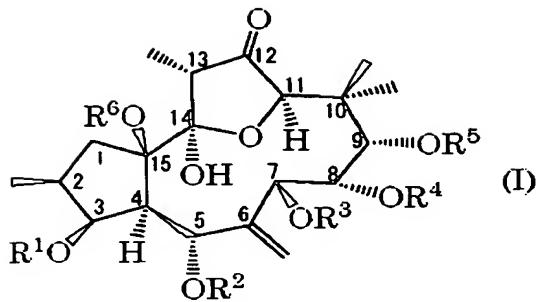
#### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、抗悪性腫瘍作用を有する新規なジテルペン化合物を提供することである。

#### 【0005】

#### 【課題を解決するための手段】

本発明の新規なジテルペン化合物は以下の一般式 (I) を有する。



式中、

$R^1$ ないし $R^6$ は、同一又は異なっていてもよく、水素原子、直鎖若しくは分岐した、飽和若しくは不飽和の、置換若しくは未置換の脂肪族基、又は一般式 $RCO-$ で表される基を意味し、式中 $R$ は直鎖若しくは分岐した、飽和若しくは不飽和の、置換若しくは未置換の脂肪族基、置換又は未置換の芳香族基又はヘテロ芳香族基を表す。

一般式(I)の化合物は、食道癌、乳腺癌などの悪性腫瘍の治療剤として使用することができる。

### 【0006】

#### 【発明の実施の形態】

一般式(I)の化合物の $R^1$ ないし $R^6$ における、脂肪族基としては直鎖若しくは分岐した、飽和又は不飽和の1～30の炭素原子を含む芳香族基が好ましく、1～16の炭素原子を含む脂肪族基がより好ましい。脂肪族基の置換基としては、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、エーテル基、カルボニル基、カルボキシル基、アミノ基、アミド基を挙げることができる。

一般式 $RCO-$ で表される基が誘導されるもとのカルボン酸のうち、 $R$ がアルキル基であるものとしては酢酸、プロピオン酸、酪酸、2,3-ジメチルブタン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸等の炭素原子数1～16の飽和脂肪酸、2,4-デカジエン酸のような炭素原子数1～16の不飽和脂肪酸等を挙げることができる。 $R$ が芳香族基であるものとしては、安息香酸、フタル酸、サリチル酸、アントラニル酸等の芳香族カルボン酸を挙

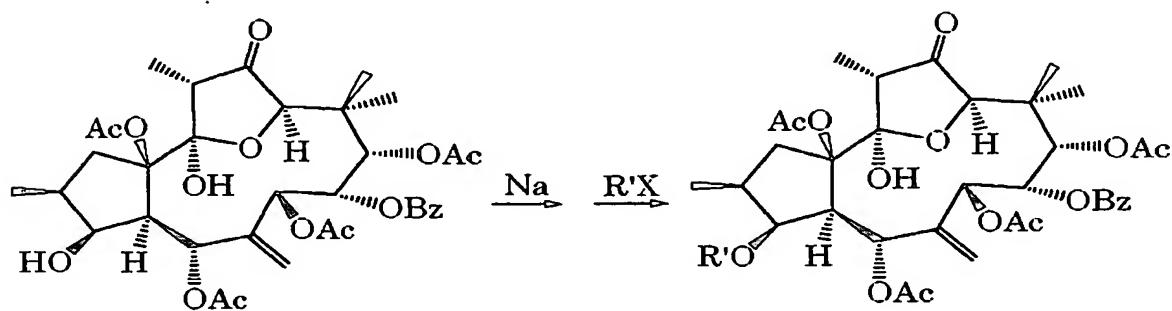
げることができる。Rがヘテロ芳香族基であるものとしては、フランカルボン酸、チオフェンカルボン酸、ピリジンカルボン酸、例えばニコチン酸、イソニコチン酸等のヘテロ芳香族カルボン酸を挙げることができる。芳香族基及びヘテロ芳香族基の置換基としては、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、エーテル基、カルボニル基、カルボキシル基、アミノ基、アミド基を挙げることができる。

### 【0007】

本発明の一般式（I）においてR<sup>1</sup>～R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>及びR<sup>6</sup>がアセチル基、R<sup>4</sup>がベンゾイル基である化合物（化合物5）及びR<sup>1</sup>～R<sup>3</sup>及びR<sup>6</sup>がアセチル基、R<sup>4</sup>がベンゾイル基、R<sup>5</sup>がニコチノイル基である化合物（化合物8）は、甘遂の根をそのまま又は乾燥して、好ましくは粉碎し、有機溶媒（例えば、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール）で室温において抽出して得ることができ、得られた抽出物を自体公知の方法で処理し、精製することにより製造することができる。

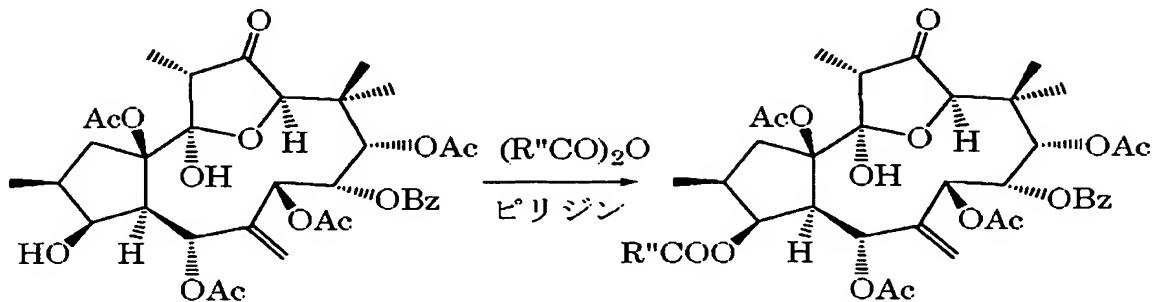
これらの化合物を出発原料として本発明の一般式（I）で表される他の化合物を製造することができる。

例えば、化合物5を加水分解してR<sup>1</sup>が水素原子である化合物を得、次いで該化合物を出発原料としてウイリアムソン合成を利用して、以下のようにナトリウムアルコキシドとハロゲン化アルキル（R'X：R'はR<sup>1</sup>と同じ意味を有し、Xはハロゲン原子を表す）の反応により、本発明のエーテル化物を得ることができる。



また、R<sup>1</sup>が水素原子である化合物を出発原料として、無水ピリジンの存在下に酸無水物（(R"CO)<sub>2</sub>O）と以下のように反応させることによって、本発明

のエステル化物を製造することができる。



### 【0008】

#### 【実施例】

##### 製造例 1

中国産の甘遂（学名：Euphorbia kansui L.）の根の乾燥品 15 kg を粉碎し、これを 60% エタノール水溶液（v/v）4.5 L に加えて、攪拌しながら室温で 12 時間浸漬した。浸漬を同一条件で 2 回繰り返し、得られた浸出液をあわせて減圧下に 40 ℃で濃縮して 1200 g のエキスを得た。これを水 4 L に溶解し、クロロホルム、酢酸エチル及びブタノールの各 4 L で、順次それぞれ 3 回ずつ抽出した。これらの画分を減圧下で濃縮して、クロロホルム画分からは 165 g、酢酸エチル画分からは 23 g、ブタノール画分からは 64 g の濃縮エキスを得た。

クロロホルム画分から得られた濃縮エキス 150 g をシリカゲルカラム (Wako gel C-200、和光純薬社製、13 × 22 cm) にのせ、ヘキサン：酢酸エチル系の展開溶媒を使用し、酢酸エチル濃度を 0%、2%、3%、5%、10%、20%、30%、50% 及び 100% とした溶媒を順次使用して展開し、第 1 ~ 第 9 の 9 画分に分画した。

### 【0009】

##### 製造例 2

実施例 1 で得た第 6 画分（20% の酢酸エチルを含むヘキサン溶媒によって溶出した画分）を、逆相カラム (ODS-7515-12A、SSC 社製) により、水：メタノー

ル系の展開溶媒を使用し、水濃度を70%、50%、40%、30%、10%及び0%とした溶媒を順次使用して展開し、第1～第6の6画分に分画した。第4画分（水濃度30%のメタノール溶媒によって溶出した画分）を順相HPLCにより分離した。シリカゲルのカラム（Shenshu-PEGASIL SILICA-60-5、250×10mm）を使用し、移動相としてクロロホルム：ヘキサン：酢酸エチル=20：65：15（v/v/v）を用い、流速4ml/min（室温）で溶出させ、溶出液をUV（254nm）で監視しつつ、保持時間15分57秒及び17分26秒にピークを示す溶出液を分取した。これらの流出液を減圧下に濃縮して、化合物3（収量50.1mg）及び化合物4（収量16.1mg）を無色蠟燭状物質として得た。

### 【0010】

#### 製造例3

製造例1で得た第6画分（20%の酢酸エチルを含むヘキサン溶媒によって溶出した画分）を、逆相カラム（ODS-7515-12A、SSC社製）により、水：メタノール系の展開溶媒を使用し、水濃度を70%、50%、40%、30%及び10%とした溶媒を順次使用して展開し、第1～第5の5画分に分画した。第5画分（水濃度10%のメタノール溶媒によって溶出した画分）を順相HPLCにより分離した。逆相カラム（Shenshu-PEGASIL、ODS社製、250×10mm）を使用し、移動相としてアセトニトリル：水=10：1（v/v）を用い、流速4ml/min（室温）で溶出させ、溶出液をRI（shodex RI-101）で監視しつつ、保持時間31分6秒及び37分12秒にピークを示す溶出液を分取した。これらの流出液を減圧下に濃縮して、化合物1（収量12.1mg）及び化合物2（収量10.1mg）を無色蠟燭状物質として得た。

第4画分（水濃度30%のメタノール溶媒によって溶出した画分）を順相HPLCにより分離した。シリカゲルのカラム（Shenshu-PEGASIL SILICA-60-5、250×10mm）を使用し、移動相としてクロロホルム：ヘキサン：酢酸エチル=30：10：10（v/v/v）を用い、流速4ml/min（室温）で溶出させ、溶出液をUV（254nm）で監視しつつ、保持時間8分30秒及び9分11秒にピークを示す溶出液を分取した。これらの流出液を減圧下に濃縮して、化合物3

(収量 1.4. 0 mg) 及び化合物 4 (収量 1. 3 mg) を無色蠟燭状物質として得た。

### 【0011】

#### 製造例 4

製造例 1 で得た第 7 画分 (30 % の酢酸エチルを含むヘキサン溶媒によって溶出した画分) を、逆相カラム (ODS-7515-12A、SSC社製) により、水：メタノール系の展開溶媒を使用し、水濃度を 70 %、50 %、40 %、30 % 及び 10 % とした溶媒を順次使用して展開し、第 1 ~ 第 5 の 5 画分に分画した。

第 2 画分 (水濃度 50 % のメタノール溶媒によって溶出した画分) の溶媒を蒸発させて結晶を得た。メタノールから再結晶して化合物 5 (200 mg) の白色針状結晶を得た。

第 1 画分 (水濃度 70 % のメタノール溶液によって溶出した画分) を逆相 HPLC により分離した。カラムとして FluoFix (type: IEW205) を用い、移動相を 45 % アセトニトリル (アセトニトリル：水 = 45 : 55 (v/v)) として流速 6.0 ml/min (室温) で溶出させ、溶出液を UV (210 nm) で監視しつつ、保持時間 1 分 0 秒及び 1 分 40 秒にピークを示す溶出液を分取した。それぞれの画分の溶媒を蒸発させ、メタノールから再結晶して、化合物 6 (20.0 mg) の白色粉末及び化合物 7 (10.0 mg) の白色針状結晶を得た。

第 3 画分 (水濃度 40 % のメタノール溶媒によって溶出した画分) を HPLC により分離した。PEGASIL ODS-2 (SSC社製、250 × 10 mm) カラムを使用し、移動相を 60 % アセトニトリル (アセトニトリル：水 = 60 : 40 (v/v)) として流速 3 ml/min (室温) で溶出させ、溶出液を UV (210 nm) で監視しつつ、保持時間 2 分 3 秒にピークを示す溶出液を分取した。得られた画分の溶媒を蒸発させ、メタノールから再結晶して、化合物 8 (40.1 mg) の白色針状結晶を得た。

化合物 1 ないし化合物 8 の MS、UV、IR のデータを表 1 に、化合物 1 ないし化合物 4 の <sup>1</sup>H NMR データを表 2 に、化合物 1 ないし化合物 4 の <sup>13</sup>C NMR データを表 3 に、化合物 5 ないし化合物 7 の <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR データを表 4 に、化合物 8 の <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR データを表 5 に示す。

【0012】

【表1】

表1 化合物1ないし化合物8のMS、UV、IRデータ

化合物	1	2	3	4
性状	無色油状	無色油状	無色油状	無色油状
HR-MS (m/z)	FAB-	EI	EI	FAB+
実測値	685.43168	628.43401	482.30318	505.29259 (M+Na)
計算値	685.43152	628.43390	482.30320	505.29300 ( $C_{30}H_{42}O_5 + Na$ )
分子量	686	628	482	628
分子式	$C_{40}H_{62}O_3$	$C_{38}H_{60}O_7$	$C_{30}H_{42}O_5$	$C_{30}H_{42}O_5$
UV $\lambda_{max}^{H=OH}$	206 (2.88)	206 (2.88)	206 (4.11)	205 (4.01)
nm ( $lg \epsilon$ )			220 (3.94)	220 (3.87)
IR $\nu^{cm^{-1}}_{max}$	3440 (OH) 1742, 1725, 1718 (C=O)	3460 (OH) 1741, 1728, 1716 (C=O)	3456 (OH) 1720 (C=O)	3443 (OH) 1719 (C=O)

表1 (続き)

	5	6	7	8
性状	白色針状結晶	白色粉末	白色針状結晶	白色針状結晶
<b>HR-EI-MS (m/z)</b>				
実測値	730. 28401	722. 25664	722. 25154	793. 29422
計算値	730. 28361	722. 25735	722. 25735	793. 29454
分子量	730	722	722	793
分子式	C <sub>37</sub> H <sub>46</sub> O <sub>15</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>43</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>43</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>41</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>15</sub>
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}}$ (lg ε)	230 (4. 00)	231 (4. 23)	230 (4. 21)	225 (4. 10)
IR $\nu_{\text{cm}^{-1}}^{\text{max}}$	3545 (OH) 1738 (C=O) 1648 (C=C)	3504 (OH) 1712 (C=O) 1650 (C=C)	3509 (OH) 1741 (C=O) 1711 (C=O)	3452 (OH) 1739 (C=O) 1652 (C=C)
		1651 (C=C)		

[0013]

【表2】

表2 化合物1ないし化合物4の<sup>1</sup>H NMRデータ(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ (ppm) (J=Hz))

化合物	1	2	3	4
H-1	6.01 d (1.5)	6.03 d (1.8)	6.07 d (1.5)	6.07 d (1.5)
H-3	5.44 s	5.35 s	5.53 s	5.48 s
H-5	3.88 d (6.9)	3.69 s	3.68d (6.9)	3.68 brs
H-7	6.07 d (3.9)	5.71 m	5.77 m	5.76 m
H-8	4.06 dd (12.6, 4.5)	3.98 m	4.01 dd (11.7, 3.6)	4.01 dd (11.7, 3.6)
H-11	2.56 m	2.54 m	2.46 m	2.44 m
H-12	2.72 dd (16.8, 3.3) 2.19 m <sup>b</sup>	2.70 dd (16.8, 3.3) 2.20 m <sup>b</sup>	2.26 m <sup>b</sup> 1.75 m <sup>b</sup>	2.26 ddd (15.9, 9.0, 3.3) 1.75 m <sup>b</sup>
H-13			0.67 m	0.67 m
H-14	1.23 m <sup>b</sup>	1.23 m <sup>b</sup>	0.90 m <sup>b</sup>	0.90 m <sup>b</sup>
Me-16	1.07 s	1.05 s	1.05 s	1.05 s
Me-17	1.19 s	1.18 s	1.08 s	1.08 s
Me-18	0.97 d (7.5)	0.97 d (6.6)	0.98 d (6.9)	0.98 d (6.9)
Me-19	1.78 d (1.5)	1.773 d (1.5)	1.79 m <sup>b</sup>	1.79 m <sup>b</sup>
H-20	4.73, 4.47 Abq (12.6)	1.777 s 3H	1.79 m <sup>b</sup>	1.79 m <sup>b</sup>
3-R <sub>1</sub>	2.31 m 1H 1.92 m 1H 0.92 d (6.9) 3H 0.96 d (6.6) 3H 1.14 d (7.2) 3H	2.31 m 1H 1.92 m 1H 0.92 d (6.9) 3H 0.96 d (6.6) 3H 1.14 d (7.2) 3H	2' 5.94 d (15.3) 3' 7.68 dd (15.3), 11.7) 4' 6.16 dd (11.7, 10.5) 5' 6.14 m <sup>b</sup> 6' 2.33 m 7' 1.43 m 8', 9' 1.29 m 10' 0.89 t (7.0)	2' 5.85 d (15.3) 3' 7.33 m 4' 6.19 m <sup>b</sup> 6' 2.15 m 7' 1.44 m 8', 9' 1.29 m 10' 0.89 t (7.0)
13-R <sub>3</sub>	2.19 t (7.5) 2H 1.55 m 2H 1.25 s -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> - 0.88 t (6.9) 3H	2.19 t (7.5) 2H 1.55 m 2H 1.25 s -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> - 0.88 t (6.9) 3H		
20-R <sub>2</sub>	20-COCH <sub>3</sub> 2.05 s 3H			

出証特2004-3008351

COPY

【0014】

【表3】

表3 化合物1ないし化合物4の<sup>13</sup>C NMRデータ (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

C	1	2	3	4
1	131.1	131.6	132.8	132.8
2	135.8 <sup>b</sup>	135.3	135.8	135.8
3	82.4	82.8	83.4	83.4
4	84.3	84.4	85.2	85.2
5	74.6	76.2	77.6	77.6
6	135.9 <sup>b</sup>	137.2	137.6	137.6
7	127.9	122.7	124.3	124.3
8	42.6	42.5	43.6	43.6
9	204.6	205.1	207.1	207.1
10	71.7	71.6	72.2	72.3
11	37.5	37.8	39.1	39.1
12	35.0	34.9	31.4	31.4
13	68.8	68.8	23.3	23.3
14	28.2	28.4	23.5	23.5
15	30.2	30.3	24.2	24.2
16	22.4	22.4	28.7	28.8
17	16.6	16.7	15.7	15.7
18	18.2	18.0	17.4	17.4
19	15.5	15.5	15.8	15.8
20	66.3	21.9	22.2	22.2
3-R <sup>1</sup>				
1'	176.7	176.9	168.0	168.1
2'	46.3	46.3	120.1	118.2
3'	31.0	31.0	141.5	146.6
4'	20.6	20.6	126.4	128.4
5'	19.1	19.1	145.4	147.1
6'	14.06	14.06	31.6	33.2
7'			28.5	28.5
8'			29.2	31.6
9'			22.5	22.6
10'			14.2	14.2
20-R <sup>2</sup>				
1"	170.4			
2"	21.0			
13-R <sup>3</sup>				
1'''	173.4	173.5		
2'''	34.3	34.3		
3'''	24.7	24.7		
4'''	29.48	29.48		
5'''	29.48	29.48		
6'''	29.34	29.34		
7'''	29.22	29.22		
8'''	29.15	29.15		
9'''	29.10	29.11		
10'''	31.79	31.79		
11'''	22.60	22.60		
12'''	13.98	13.97		

<sup>b</sup>割り当ては交換される可能性がある。

【0015】

【表4】

表4 化合物5ないし化合物7の<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMRデータ  
[(500 MHz and 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ (ppm) (J = Hz))]

position	7		6		5	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1	4.93 s	83.4	4.32 d (3.9)	87.1	2.65 dd (6.4,13.9)	40.3
2		80.0		78.3	2.20 m	38.8
3	5.38 d (4.9)	79.7	5.54 d (4.9)	76.7	5.58 m	74.4
4	3.48 m	46.4	3.61 dd (11.3, 4.8)	45.1	2.97 brs	51.4
5	5.95 s	74.3	5.91 m	73.8	6.13 s	70.1
6		135.8		135.8		145.4
7	5.87 s	65.1	5.89 m	64.6	6.39 s	69.1
8	4.70 d (9.4)	72.5	4.65 d (9.2)	72.7	6.05 s	71.0
9		209.3		209.5	5.07 s	82.4
10		47.9		48.1		41.5
11	3.65 d (2.1)	61.2	3.69 d (2.2)	60.8	4.13 s	77.5
12	3.43 m	58.0	3.33 dd (2.4, 9.4)	59.0		214.0
13	3.26 m	41.6	3.93 m	42.6	2.28 q (6.5)	50.7
14		211.4		204.9		106.3
15		84.8		96.1		90.6
16	1.32 s	19.4	1.31 s	20.2	0.92 d (6.3)	13.3
17	6.31 s	127.9	6.52 brs	128.3	5.24 s	106.3
		5.91 s	5.94 brs		5.14 s	
18	1.33 s	21.6	1.34 s	21.6	1.29 s	18.6
19	0.85 s	18.9	0.85 s	19.0	1.14 s	22.1
20	1.66 d (6.4)	19.2	1.52 d (6.4)	17.0	1.30 d (6.5)	9.21
Acetyls			Acetyl s		Acetyl s	
CO-1		170.6	CO-15		CO-3, 15	
				172.4		169.5
						170.2
COMe-1	2.13 s	20.3	COMe-15 2.31 s		COMe- 1.98 s	22.0
				21.3	3,15 2.09 s	21.3
CO-3		169.8	CO-3		CO-5	168.8
COMe-3	1.95 s	20.6	COMe-3 1.89 s		COMe-5 1.91 s	20.9
				20.4	CO-7	170.3
					COMe-7 2.18 s	21.1
					CO-9	169.2
					COMe-9 2.07 s	20.4
Benzoyls			Benzoyls		Benzoyls	
CO-5		164.8			CO-8	165.4
COPh- 1		128.3			COPh-8 1	130.1
5	2,6 7.48 m	129.1	7.55 m		129.3 2,6 8.03 m	129.9
	3,5 6.88 m	127.7	7.02 m		127.7 3,5 7.42 m	128.3
	4 7.09 m	132.6	7.22 m		132.8 4 7.53 m	132.9
CO-7		166.2			166.0	
COPh- 1		128.6			128.4	
7	2,6 7.53 m	129.4	7.50 m		129.5	
	3,5 7.02 m	127.9	6.92 m		127.8	
	4 7.24 m	132.9	7.11 m		132.8	
OH-2	2.32 s		OH-2 2.52 s			
OH-8	3.53 d (9.4)		OH-8 3.54 d (9.4)			
OH-15	4.11 s		OH-1 3.92 d (3.9)			

【0016】

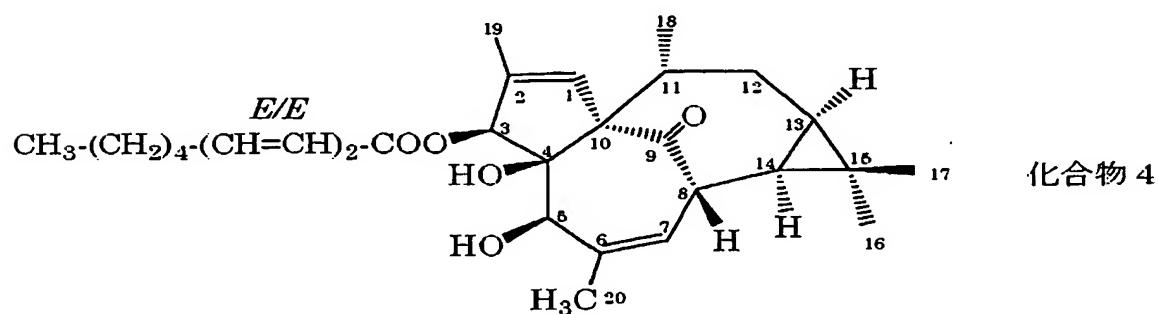
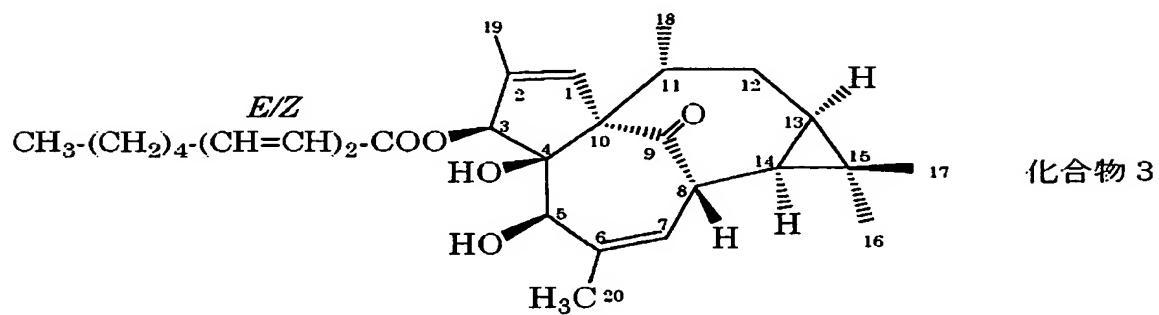
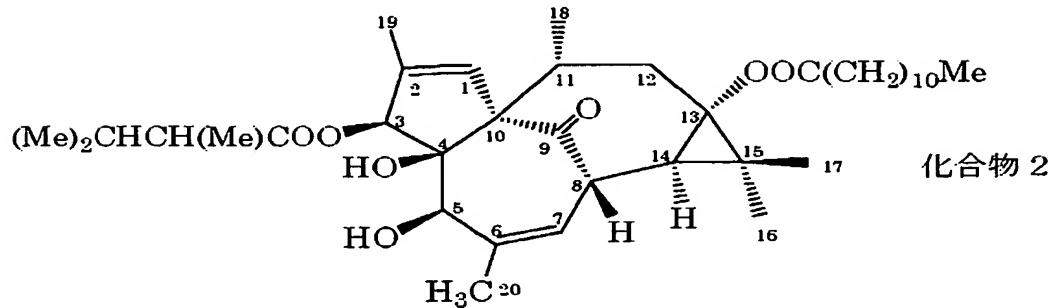
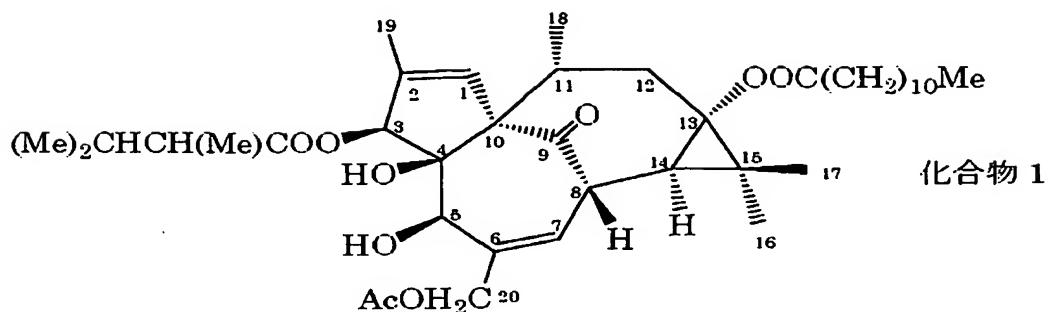
【表5】

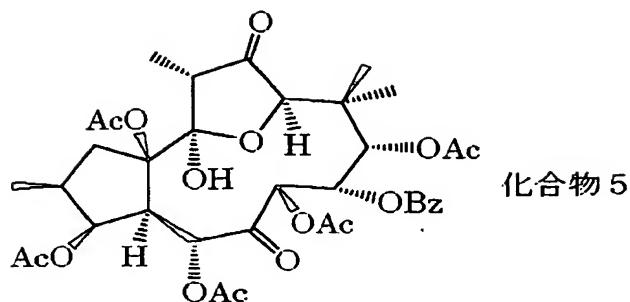
表5 化合物8の<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMRデータ (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

atom	8	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1α	2.68 dd (4.5, 12.0)	39.9
1β	2.19 m <sup>b</sup>	
2	2.20 m <sup>b</sup>	38.7
3	5.58 brs	74.1
4	3.05 d (2.7)	51.4
5	6.19 s	69.5
6		144.7
7	6.43 s	69.1
8	6.17 s	71.0
9	5.36 s	83.3
10		41.7
11	4.30 s	77.4
12		213.6
13	2.33 q (6.6)	50.9
14		106.4
15		90.5
16	0.92 d (6.0)	13.2
17a	5.17 s	109.9
17b	4.99 s	
18	1.21 s	22.1
19	1.40 s	18.7
20	1.32 d (6.5)	9.18
3-COMe	2.09 s	169.5 21.2
5-COMe	1.95 s	168.3 20.8
7-COMe	1.51 s	170.0 20.3
15-COMe	2.00 s	168.8 21.9
8-benzoyl		164.9 129.7
	8.03 m	129.5
	7.41 m	127.8
	7.55 m	133.1
9-nicotinoyl	9.18 s	162.7
	8.77 d (4.2)	152.7
	8.31 d (7.8)	150.0
	7.39 m <sup>b</sup>	137.4 125.0 123.2

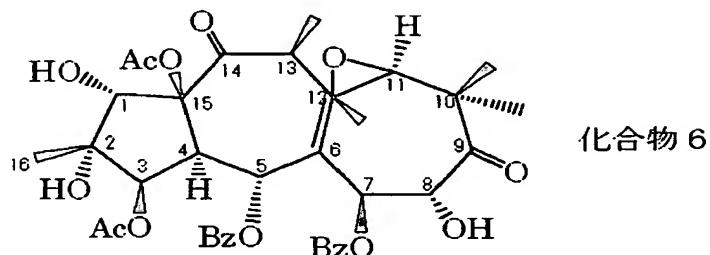
【0017】

以上のデータから、化合物1ないし化合物8は以下の構造式を有することが確認された。

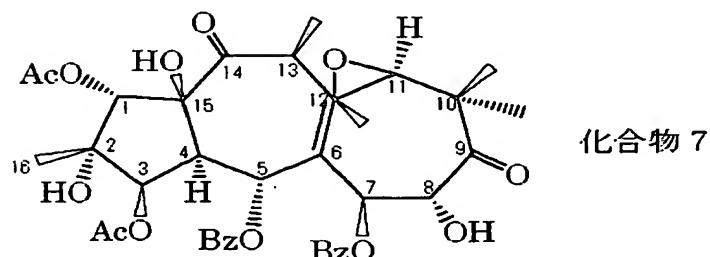




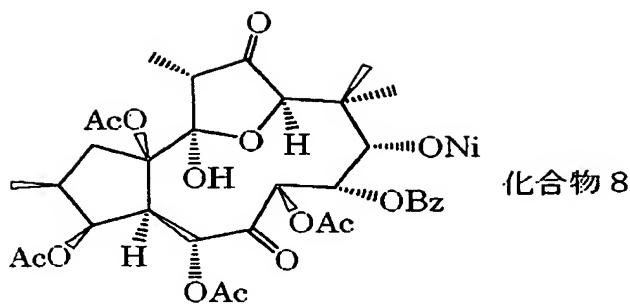
式中、A c はアセチル基、B z はベンゾイル基を表す。



式中、A c はアセチル基、B z はベンゾイル基を表す。



式中、A c はアセチル基、B z はベンゾイル基を表す。



式中、A c はアセチル基、B z はベンゾイル基、N i はニコチノイル基を表す。

#### 【0018】

本発明の化合物は細胞増殖を阻害する作用を有し、この作用を以下に述べるアニマルキップアッセイ法によって確認した。アニマルキップアッセイ法の詳細は、Godsave, S. F. and Slack, J. M. W. (1989年), Dev. Biol. 134: 486-490を参照。

アフリカツメガエルの胞胎後期のアニマルキップ細胞をピンセットで培養液中に分離する。分離したアニマルキップ細胞の動物極組織から細胞を分離し、培養液中に移して細胞分散液を調製する。

0. 2 mg/ml のユーグロプリンを含む 50 % のアニマルメディウムを含むテラサキプレートに、得られた細胞分散液を入れる。本発明の化合物を 10 μg/ml 含む溶液をテラサキプレートに加え、翌日顕微鏡で個々の細胞が分裂しているかどうかを観察した。阻害率は (分裂していない細胞の数) / (細胞の総数) である。結果を表6に示す。

表6 細胞分裂の阻害作用

化合物番号	阻害率 (%)
化合物 3	53.0%
化合物 4	55.1%

化合物の濃度は 10 μg/ml である。

#### 【0019】

表6 から明らかなように、本発明の化合物は細胞分裂の阻害作用を有すること

から、食道癌、乳腺癌などの悪性腫瘍の治療剤として有用である。

本発明の化合物を経口、非経口又は経皮投与することができる。投与量は成人一人の1日、体重1kg当たり0.1mg～100mgが適当である。

本発明の化合物を種々の剤形で投与することができ、例えば錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、注射剤、座剤、軟膏剤、パップ剤等の形態で投与することができる。本発明の化合物をこれらの剤形に形成する場合、これらの製剤化に通常使用する担体や添加物、例えば溶剤、基剤、希釈剤、充填剤などの賦形剤、溶解補助剤、乳化剤、分散剤、崩壊剤、可溶化剤、増粘剤、滑沢剤等の補助剤、抗酸化剤、保存剤、芳香剤、甘味剤等の添加剤を常法に従って使用し、製剤化することができる。

#### 【0020】

#### 【発明の効果】

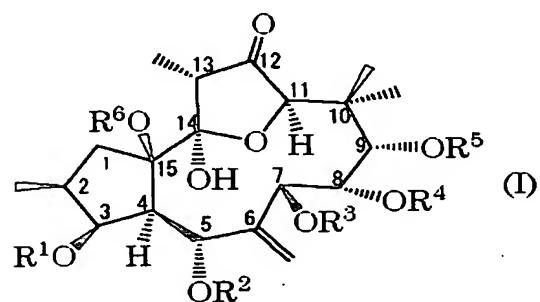
本発明の化合物は、抗悪性腫瘍作用を有する新規なジテルペン化合物であり、抗悪性腫瘍剤として有用である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗腫瘍活性を有する新規な化合物を提供すること。

【解決手段】 本発明の新規な化合物は式（I）で表されるジテルペン化合物である。式中、R<sup>1</sup>ないしR<sup>6</sup>は脂肪族基又は一般式RCOーで表される基を意味し、式中Rは脂肪族基、芳香族基又はヘテロ芳香族基を表す。本発明の化合物は、甘遂（学名：Euphorbia kansui L.）の根から有機溶媒（クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール）により抽出することができ、得られた化合物を出発原料として自体公知の方法に従って製造することができる。本発明の化合物は細胞増殖阻害作用を有し、抗悪性腫瘍剤として有用である。



【選択図】 なし

特願 2003-201340

出願人履歴情報

識別番号 [899000057]

1. 変更年月日 1999年 9月17日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都千代田区九段南四丁目8番24号  
氏名 学校法人日本大学

出証番号 出証特2004-3008351

COPY

## DECLARATION

I, Koji HIRAYAMA, patent attorney of NAKAMURA & PARTNERS, 3-1, Marunouchi 3-Chome, Chiyoda-Ku, Tokyo, Japan, hereby declare that I am conversant with Japanese and English Language and that the content of the specification and claims of the priority document of the basic Japanese patent application No. 2003-201340 filed on July 24, 2003.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.



Koji HIRAYAMA

Patent Attorney

Dated: July 21, 2005

JAPAN PATENT OFFICE

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application : July 24, 2003

Application Number : Patent Application No. 2003-201340

Applicant(s) : NIHON UNIVERSITY

February 10, 2004

Yasuo IMAI  
Commissioner,  
Japan Patent Office

Certificate No. 2004-3008351

【Name of Document】 Patent Application  
【File Reference】 Y1K0562  
【Specific Notes】 Patent application claiming benefits under Article 30 of the Japanese Patent Law  
【Filing Date】 July 24, 2003  
【Address】 Commissioner, Patent Office  
【Inventor】  
    【Address】 c/o NIHON UNIVERSITY, 8-24, Kudan-Minami 4-Chome, Chiyoda-Ku, Tokyo, JAPAN  
    【Name】 Susumu KITANAKA  
    【Inventor】  
    【Address】 c/o NIHON UNIVERSITY, 8-24, Kudan-Minami 4-Chome, Chiyoda-Ku, Tokyo, JAPAN  
    【Name】 Syohei MIYATA  
    【Inventor】  
    【Address】 c/o SHENYANG PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, 103, Wenhua Road, Shenhe District, Shenyang 110016, PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA  
    【Name】 Liyan WANG  
    【Inventor】  
    【Address】 c/o TRADITIONAL CHINESE MEDICINES & NATURAL PRODUCTS RESEARCH CENTER SHENZHEN, No. 710, 7/F, C Unit Bldg. of Research Institute of Tsinghua University Shenzhen, South, SHENZHEN Hi-Tech Industrial Park, 518057, PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA  
    【Name】 Naili WANG  
    【Inventor】  
    【Address】 c/o TRADITIONAL CHINESE MEDICINES & NATURAL PRODUCTS RESEARCH CENTER SHENZHEN, No. 710, 7/F, C Unit Bldg. of Research Institute of Tsinghua University Shenzhen, South, SHENZHEN Hi-Tech Industrial Park, 518057, PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA  
    【Name】 Xinsheng YAO  
【Applicant】  
    【Discrimination Number】 899000057  
    【Name】 NIHON UNIVERSITY

【Agent】  
【Discrimination Number】 100059959  
【Patent Attorney】  
【Name】 Minoru NAKAMURA

【Agent】  
【Discrimination Number】 100067013  
【Patent Attorney】  
【Name】 Fumiaki OHTSUKA

【Agent】  
【Discrimination Number】 100082005  
【Patent Attorney】  
【Name】 Yoshio KUMAKURA

【Agent】  
【Discrimination Number】 100065189  
【Patent Attorney】  
【Name】 Kaichi SHISHIDO

【Agent】  
【Discrimination Number】 100074228  
【Patent Attorney】  
【Name】 Toshio IMASHIRO

【Agent】  
【Discrimination Number】 100084009  
【Patent Attorney】  
【Name】 Nobuo OGAWA

【Agent】  
【Discrimination Number】 100082821  
【Patent Attorney】  
【Name】 Hiroo MURAKOSO

【Agent】  
【Discrimination Number】 100086771  
【Patent Attorney】  
【Name】 Takaki NISHIJIMA

【Agent】  
【Discrimination Number】 100084663  
【Patent Attorney】  
【Name】 Atsushi HAKODA

【Agent】  
【Discrimination Number】 100114007  
【Patent Attorney】  
【Name】 Koji HIRAYAMA

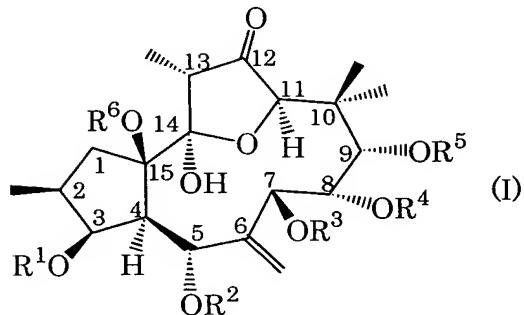
【Indication of Fee】  
【Prepayment Ledger Number】 008604  
【Amount of Payment】 21,000 yen

【List of the attached materials】  
【Name of Material】 Specification 1  
【Name of Material】 Abstract 1  
【Proof Required or Not】 Yes

[Title of the invention] NOVEL DITERPENE COMPOUNDS

[Claims]

1. A diterpene compound represented by the general formula (I):

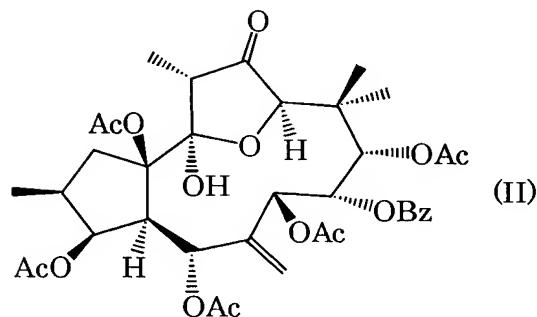


(I)

in which,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> and R<sup>6</sup> may be same or different and represent hydrogen atoms, liner or branched, saturated or unsaturated, substituted or unsubstituted aliphatic groups, or radicals represented by the general formula RCO<sup>·</sup>; wherein R denotes a liner or branched, saturated or unsaturated, substituted or unsubstituted aliphatic group, a substituted or unsubstituted aromatic or heteroaromatic group.

2. A compound according to claim 1, wherein said compound is represented by the formula (II):

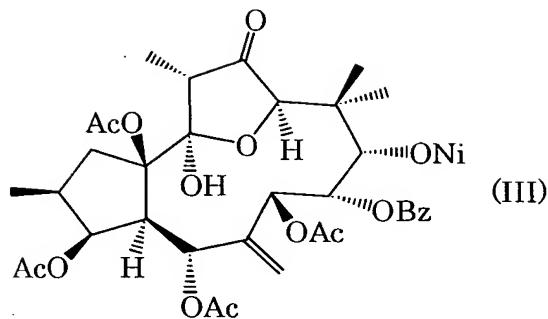


(II)

in which,

Ac represents an acetyl radical and Bz represents a benzoyl radical.

3. A compound according to claim 1, wherein said compound is represented by the formula (III):



in which,

Ac represents a acetyl radical, Bz represents a benzoyl radical and Ni represents a nicotinoyl radical.

[Detailed explanation of the invention]

[0001]

[Technical field of the invention]

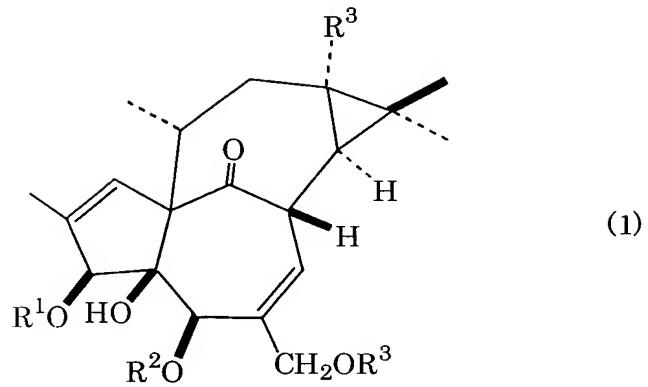
The present invention relates to novel diterpene compounds isolated from Kan Sui, which is useful as antineoplastics.

[0002]

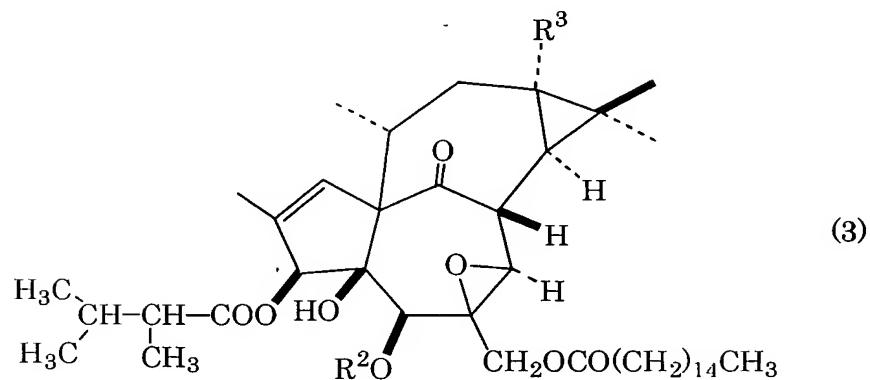
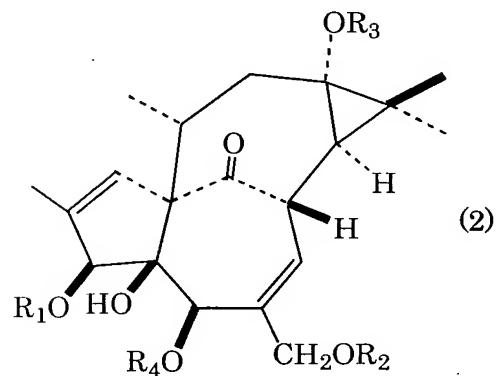
[Prior art]

Kan Sui (*Euphorbia kansui* L.) is a perennial plant belonging to Euphorbiaceae and growing in northwest China. Kan Sui has been used in China as herbal remedy for treating allergic diseases such as chronic bronchitis and bronchial asthma, and malignant tumors such as esophagus cancer and breast cancer. Investigations of components in Kan Sui began in about 1943 and over ten diterpene and triterpene compounds have been found to date. Recent studies have shown that some of these diterpene compounds have anticancer activity, antiviral activity and cytotoxic activity, and thus, many investigators pay attention to these compounds.

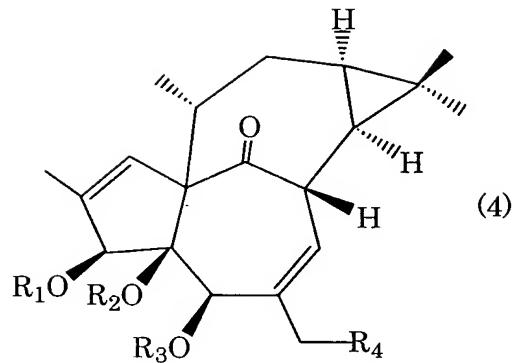
S. M. Kupchan et. al. showed that Ingenol derivatives extracted from *Euphorbia esula* L. and represented by the general formula (1) below have depressive activities against P-388 lymphocytic leukemia in mice. (Non-patent literature 1)



Tian-Shung Wu et. al. showed that kansuiphorin A and kanusiphorin B extracted from the roots of Euphorbia kansui L. and represented by the general formulae (2) and (3) respectively, have depressive activities against P-388 cells in vivo. (Non-patent literature 2)



Magdalena Blanco-Molina et. al. stated that Ingenol derivatives represented by the general formula (4) below were possible to induce apoptosis in Jurkat cells. (Non-patent literature 3)



However, any prior art does not disclose compounds of the present invention.

[0003]

[Non-patent literature 1]

S. Morris Kupchan, et. al., Science, Vol. 191, pp. 571-572, 13, Feb., 1976.

[Non-patent literature 2]

Tian-Shung Wu, et. al., J. Nat. Prod., Vol. 54, No. 3, pp. 823-829, 1991.

[Non-patent literature 3]

Magdalena Blanco-Molina, et. al., Chemistry & Biology, 8/8, pp. 767-778, 2001.

[0004]

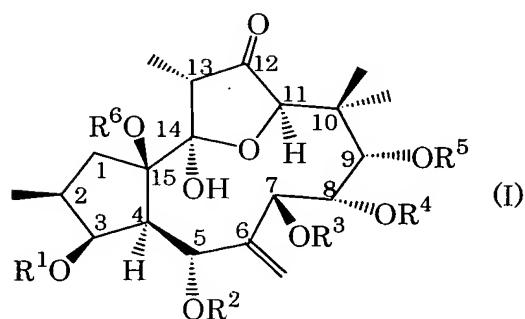
[Problem to be solved]

An object of the present invention is to provide novel diterpene compounds with antineoplastic activities.

[0005]

[Means for solving the problem]

Novel diterpene compounds of the present invention are represented by the following general formula (I).



in which,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> and R<sup>6</sup> may be same or different and represent hydrogen atoms, liner or branched, saturated or unsaturated, substituted or unsubstituted aliphatic groups, or

radicals represented by the general formula  $\text{RCO}\cdot$ , wherein R denotes a liner or branched, saturated or unsaturated, substituted or unsubstituted aliphatic group, a substituted or unsubstituted aromatic or heteroaromatic group.

The compounds represented by the formula (I) are useful as a therapeutic agent for treating malignant tumors, such as esophagus cancer, breast cancer, and so on.

[0006]

[Mode for carrying out the invention]

$\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  and  $\text{R}^6$  in the formula (I) represent preferably liner or branched, saturated or unsaturated aliphatic groups containing preferably from 1 to 30 carbon atoms, and more preferably from 1 to 16 carbon atoms. The aliphatic group may be substituted with a halogen atom, a hydroxyl group, an ether group, a carbonyl group, a carboxyl group, an amino group and an amide group.

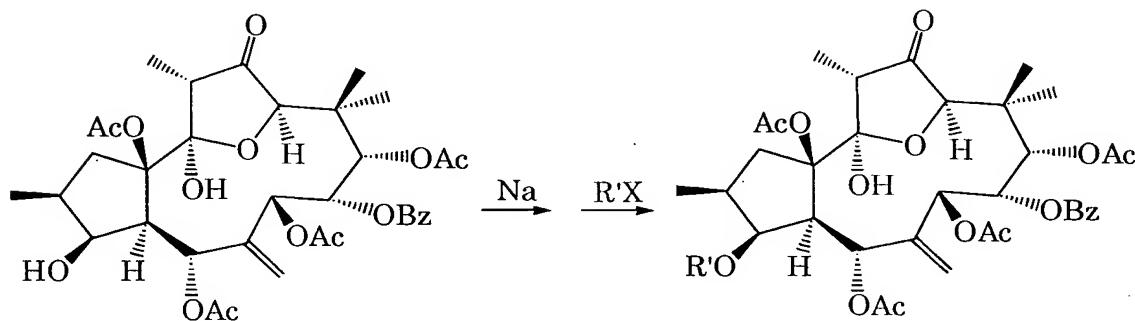
Examples of carboxylic acids from which the  $\text{RCO}\cdot$  radical wherein R represents an alkyl radical is derived include saturated aliphatic acids containing from 1 to 16 carbon atoms, such as acetic acid, propionic acid, butyric acid, 2,3-dimethyl butanoic acid, caprylic acid, capric acid, lauric acid, myristic acid, palmitic acid, and unsaturated aliphatic acids containing from 3 to 16 carbon atoms, such as 2,4-decadienoic acid. Examples of carboxylic acids from which the  $\text{RCO}\cdot$  radical wherein R represents an aromatic radical is derived include aromatic carboxylic acids, such as benzoic acid, phthalic acid, salicylic acid, and anthranilic acid. Examples of carboxylic acid from which the  $\text{RCO}\cdot$  radical wherein R represents an heteroaromatic radical is derived include furancarboxylic acid, thiophenecarboxylic acid, pyridinecarboxylic acid, such as nicotinic acid and iso-nicotinic acid. The aromatic and heteroaromatic radicals may be substituted with halogen atoms, hydroxyl radicals, ether radicals, carbonyl radicals, carboxyl radicals, amino radicals, and amide radicals.

[0007]

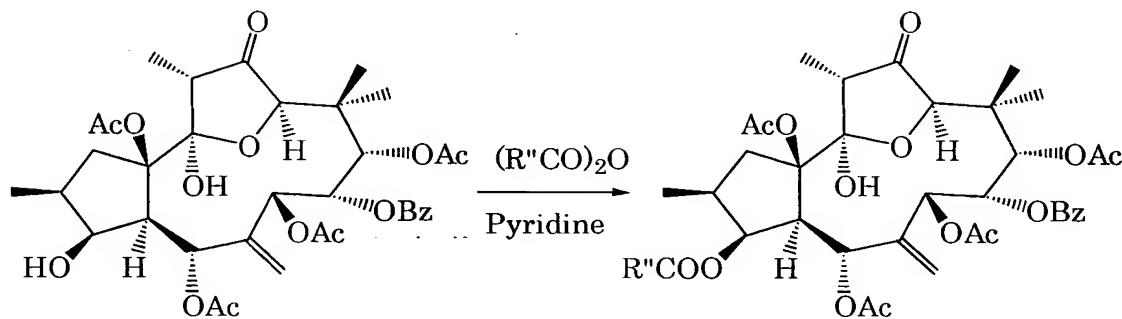
A compound represented by the general formula (I), wherein  $\text{R}^1$  to  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^5$  and  $\text{R}^6$  are acetyl radicals and  $\text{R}^4$  is a benzoyl radical (Compound 5) and a compound represented by the general formula (I), wherein  $\text{R}^1$  to  $\text{R}^3$  and  $\text{R}^6$  are acetyl radicals,  $\text{R}^4$  is a benzoyl radical and  $\text{R}^5$  is a nicotinoyl radical (Compound 8) are prepared by extracting raw or dried, and preferably ground roots of Euphorbia kansui L. with organic solvents, such as chloroform, ethyl acetate and butanol at a room temperature, and then purifying the extracts according to known procedures.

These extracted compounds may be used as starting materials for the preparation of other compounds represented by the general formula (I). For example, Compound 5 is

hydrolyzed to give the compound of formula (I) wherein R<sup>1</sup> is a hydrogen atom, and then the obtained hydroxyl compound is converted to ether compounds of the present invention in accordance with the Williamson Synthesis described below, that is, by the action of sodium alkoxides and then alkyl halides R'X wherein R' has the same meaning as R<sup>1</sup> and X represents a halogen atom:



Further, the hydrolyzed Compound 5 wherein R<sup>1</sup> is a hydrogen atom may be reacted with acid anhydrides, i. e., (R"CO)<sub>2</sub>O as described below in the presence of anhydrous pyridine to give ester compounds of the present invention.



[0008]

[Examples]

Example 1

To 15 Kg of the dried roots of Euphorbia kansui L. collected in People's Republic of China were ground and extracted with 45 L of 60 % aqueous ethanol (v/v) for 12 hours at a room temperature with stirring. The extraction was repeated again under the same conditions. The extracts were combined together and concentrated under reduced pressure at 40 °C to give a concentrated extract (1200 g). The extract was dissolved in 4 L of water and extracted with chloroform (3 x 4 L), ethyl acetate (3 x 4 L) and n-butanol (3 x 4 L) in this order. These fractions were concentrated under reduced pressure to give 165 g, 23 g and 64 g of concentrated extracts from the chloroform, ethyl acetate and n-butanol fractions,

respectively.

150 g of the extract obtained from the chloroform fraction was subjected to silica gel chromatography (Wako gel C-300, Wako Pure Chemical Industry, 13 x 22 cm) and eluted with hexane/ethyl acetate gradually changed from whose ethyl acetate concentration is 0 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, to 100 % to give fraction Nos. 1 to 9.

#### [0009]

##### Example 2

The fraction No. 6 obtained in Example 1 (a fraction eluted with a hexane solution containing 20 % of ethyl acetate) was applied to reversed phase column chromatography (ODS-7515-12A, SSC) and eluted with water/methanol gradually changed from whose water concentration is 70 %, 50 %, 40 %, 30 %, 10 %, to 0 % to give fraction Nos. 1 to 6.

The fraction No. 4 (a fraction eluted with a methanol solution containing 30 % water) was purified by normal phase HPLC. Silica gel (Shenshu- PEGASIL SILICA-60-5, 250 x 10 mm) was used as a stationary phase and chloroform : hexane : ethyl acetate = 20 : 65 : 15 (v/v/v) was used as a mobile phase. The fraction was eluted at a flow rate of 4 ml/min (room temperature) and eluents were monitored by a UV detector at 254 nm and eluents having retention times of 15.95 min and 17.43 min were fractionated respectively. These two eluents were concentrated under reduced pressure to give Compound 3 (yield: 50.1 mg) and Compound 4 (yield: 16.1 mg) as colorless waxy materials.

#### [0010]

##### Example 3

The No. 6 fraction obtained in Example 1 (a fraction eluted with a hexane solution containing 20 % of ethyl acetate) was applied to reversed phase column chromatography (ODS-7515-12A, obtained from SSC) and eluted with water/methanol gradually changed from whose water concentration is 70 %, 50 %, 40 %, 30 %, to 10 % to give fraction Nos. 1 to 5. The fraction No.5 (a fraction eluted with a methanol solution containing 10 % of water) was purified by normal phase HPLC. A reverse phase column (Shenshu- PEGASIL, obtained from ODS, 250 x 10 mm) was used and acetonitrile : water = 10 : 1 (v/v) was used as a mobile phase. The fraction was eluted at a flow rate of 4 ml/min (room temperature) and eluents were monitored by a RI detector (shodex RI-101) and eluents having retention times of 31.1 min and 37.2 min were fractionated respectively. These two eluents were concentrated under reduced pressure to give Compound 1 (yield: 12.1 mg) and Compound 2 (yield: 10.1 mg) as colorless waxy materials.

The fraction No. 4 (a fraction eluted with a methanol solution containing 30 % of water) was purified by a normal phase HPLC. Silica gel (Shenshu- PEGASIL SILICA-60-5, 250 x 10 mm) was used as a stationary phase and chloroform : hexane : ethyl acetate = 30 : 10 : 10 (v/v/v) was used as a mobile phase. The fraction was eluted at a flow rate of 4 ml/min

(room temperature) and eluents were monitored by a UV detector at 254 nm and eluents having retention times of 8.5 min and 9.18 min were fractionated respectively. These two eluents were concentrated under reduced pressure to give Compound 3 (yield: 14.0 mg) and Compound 4 (yield: 1.3 mg) as colorless waxy materials.

### [0011]

#### Example 4

The fraction No. 7 obtained in Example 1 (a fraction eluted with a hexane solution containing 30 % of ethyl acetate) was applied to reversed phase column chromatography (ODS-7515-12A, obtained from SSC) and eluted with water/methanol gradually changed from whose water concentration is 70 %, 50 %, 40 %, 30 %, to 10 % to give fraction Nos. 1 to 5.

A solvent of the fraction No. 2 (a fraction eluted with a methanol solution containing 50 % of water) was evaporated to give a crystal. Recrystallization of the crystal from methanol gives Compound 5 (yield: 200 mg) as a white needle crystal.

The fraction No. 1 (a fraction eluted with a methanol solution containing 70 % of water) was purified by reversed phase HPLC. FluoFix (type: IEW205) was used as a stationary phase and 45 % acetonitrile solution (acetonitrile : water = 45 : 55 (v/v)) was used as a mobile phase. The fraction was eluted at a flow rate of 6.0 ml/min (room temperature) and eluents were monitored by a UV detector at 210 nm and eluents having retention times of 11.0 min and 12.67 min were fractionated respectively. These two fractions were evaporated and recrystallized from methanol to give Compound 6 (yield: 20.0 mg) and Compound 7 (yield: 10.0 mg) as a white powder and a white needle crystal respectively.

The fraction No. 3 (a fraction eluted with a methanol solution containing 40 % of water) was purified by HPLC. PEGASIL ODS-2 (obtained from SSC, 250 x 10 mm) was used and 60 % acetonitrile solution (acetonitrile : water = 60 : 40 (v/v)) was used as a mobile phase. The fraction was eluted at a flow rate of 3.0 ml/min (room temperature) and eluents were monitored by a UV detector at 210 nm and an eluent having retention time of 26.05 min was fractionated. The fraction was evaporated and recrystallized from methanol to give Compound 8 (yield: 40.1 mg) as a white needle crystal.

The MS, UV and IR data for Compounds 1 to 8 in Table 1, <sup>1</sup>H NMR data for Compounds 1 to 4 in Table 2, <sup>13</sup>C NMR data for Compounds 1 to 4 in Table 3, <sup>1</sup>H NMR data and <sup>13</sup>C NMR data for compounds 5 to 7 in Table 4, <sup>1</sup>H NMR data and <sup>13</sup>C NMR data for Compound 8 in Table 5.

[0012]

Table 1 MS, UV, IR data for Compounds 1 to 8

Compound	1	2	3	4
form	colorless oil	colorless oil	colorless oil	colorless oil
HR-MS (m/z)	FAB-	EI	EI	FAB+
found	685.43168	628.43401	482.30318	505.29259(M+Na)
calculated	685.43152	628.43390	482.30320	505.29300(C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>6</sub> +Na)
molecular weight	686	628	482	628
molecular formula	C <sub>40</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	206 (2.88)	206 (2.88)	206 (4.11)	205 (4.01)
nm (lg ε )			220 (3.94)	220 (3.87)
IR $\nu \text{ cm}^{-1}_{\text{max}}$	3440 (OH) 1742, 1725, 1718 (C=O)	3460 (OH) 1741, 1728, 1716 (C=O)	3456 (OH) 1720 (C=O)	3443 (OH) 1719 (C=O)

Table 1 (continued)

Compound	5	6	7	8
form	white needle crystal	white powder	white needle crystal	white needle crystal
HR-EI-MS(m/z)				
found	730.28401	722.25664	722.25154	793.29422
calculated	730.28361	722.25735	722.25735	793.29454
molecular weight	730	722	722	793
molecular formula	C <sub>37</sub> H <sub>46</sub> O <sub>15</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>43</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>43</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>41</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>15</sub>
UV $\lambda_{\text{nm}}^{\text{max}}(\lg \epsilon )$	230 (4.00)	231(4.23)	230(4.21)	225(4.10)
IR $\nu \text{ cm}^{-1}_{\text{max}}$	3545 (OH) 1738 (C=O) 1648 (C=C)	3504 (OH) 1712 (C=O) 1650 (C=C)	3509 (OH) 1741 (C=O) 1711 (C=O)	3452 (OH) 1739 (C=O) 1652 (C=C) 1651 (C=C)

## [0013]

Table 2 <sup>1</sup>H NMR data for Compounds 1, 2, 3, and 4 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ (ppm) (J=Hz)

Attribution	1	2	3	4
H-1	6.01 d (1.5)	6.03 d (1.8)	6.07 d (1.5)	6.07 d (1.5)
H-3	5.44 s	5.35 s	5.53 s	5.48 s
H-5	3.88 d (6.9)	3.69 s	3.68d (6.9)	3.68 brs
H-7	6.07 d (3.9)	5.71 m	5.77 m	5.76 m
H-8	4.06 dd (12.6, 4.5)	3.98 m	4.01 dd (11.7, 3.6)	4.01 dd (11.7, 3.6)
H-11	2.56 m	2.54 m	2.46 m	2.44 m
H <sub>2</sub> -12	2.72 dd (16.8, 3.3) 2.19 m <sup>b</sup>	2.70 dd (16.8, 3.3) 2.20 m <sup>b</sup>	2.26 m <sup>b</sup> 1.75 m <sup>b</sup>	2.26 ddd (15.9, 9.0, 3.3) 1.75 m <sup>b</sup>
H-13			0.67 m	0.67 m
H-14	1.23 m <sup>b</sup>	1.23 m <sup>b</sup>	0.90 m <sup>b</sup>	0.90 m <sup>b</sup>
Me-16	1.07 s	1.05 s	1.05 s	1.05 s
Me-17	1.19 s	1.18 s	1.08 s	1.08 s
Me-18	0.97 d (7.5)	0.97 d (6.6)	0.98 d (6.9)	0.98 d (6.9)
Me-19	1.78 d (1.5)	1.773 d (1.5)	1.79 m <sup>b</sup>	1.79 m <sup>b</sup>
H-20	4.73, 4.47 Abq (12.6)	1.777 s 3H	1.79 m <sup>b</sup>	1.79 m <sup>b</sup>
3-R <sub>1</sub>	2.31 m 1H 1.92 m 1H 0.92 d (6.9) 3H 0.96 d (6.6) 3H 1.14 d (7.2) 3H	2.31 m 1H 1.92 m 1H 0.92 d (6.9) 3H 0.96 d (6.6) 3H 1.14 d (7.2) 3H	2' 5.94 d (15.3) 3' 7.68 dd (15.3, 11.7) 4' 6.16 dd (11.7, 10.5) 5' 6.14 m <sup>b</sup> 6' 2.33 m 7' 1.43 m 8', 9' 1.29 m 10' 0.89 t (7.0)	2' 5.85 d (15.3) 3' 7.33 m 4' 6.19 m <sup>b</sup> 5' 6.19 m <sup>b</sup> 6' 2.15 m 7' 1.44 m 8', 9' 1.29 m 10' 0.89 t (7.0)
13-R <sub>3</sub>	2.19 t (7.5) 2H 1.55 m 2H 1.25 s -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> - 0.88 t (6.9) 3H	2.19 t (7.5) 2H 1.55 m 2H 1.25 s -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> - 0.88 t (6.9) 3H		
20-R <sub>2</sub>	20-COCH <sub>3</sub> 2.05 s 3H			

[0014]

Table 3  $^{13}\text{C}$  NMR data for Compounds 1, 2, 3 and 4 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

C	1	2	3	4
1	131.1	131.6	132.8	132.8
2	135.8 <sup>b</sup>	135.3	135.8	135.8
3	82.4	82.8	83.4	83.4
4	84.3	84.4	85.2	85.2
5	74.6	76.2	77.6	77.6
6	135.9 <sup>b</sup>	137.2	137.6	137.6
7	127.9	122.7	124.3	124.3
8	42.6	42.5	43.6	43.6
9	204.6	205.1	207.1	207.1
10	71.7	71.6	72.2	72.3
11	37.5	37.8	39.1	39.1
12	35.0	34.9	31.4	31.4
13	68.8	68.8	23.3	23.3
14	28.2	28.4	23.5	23.5
15	30.2	30.3	24.2	24.2
16	22.4	22.4	28.7	28.8
17	16.6	16.7	15.7	15.7
18	18.2	18.0	17.4	17.4
19	15.5	15.5	15.8	15.8
20	66.3	21.9	22.2	22.2
3-R <sup>1</sup>				
1'	176.7	176.9	168.0	168.1
2'	46.3	46.3	120.1	118.2
3'	31.0	31.0	141.5	146.6
4'	20.6	20.6	126.4	128.4
5'	19.1	19.1	145.4	147.1
6'	14.06	14.06	31.6	33.2
7'			28.5	28.5
8'			29.2	31.6
9'			22.5	22.6
10'			14.2	14.2
20-R <sup>2</sup>				
1"	170.4			
2"	21.0			
13-R <sup>3</sup>				
1'''	173.4	173.5		
2'''	34.3	34.3		
3'''	24.7	24.7		
4'''	29.48	29.48		
5'''	29.48	29.48		
6'''	29.34	29.34		
7'''	29.22	29.22		
8'''	29.15	29.15		
9'''	29.10	29.11		
10'''	31.79	31.79		
11'''	22.60	22.60		
12'''	13.98	13.97		

<sup>b</sup> Assignments may be interchanged.

## [0015]

Table 4  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR data for Compounds 5 – 7 [(500 MHz and 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm) ( $J$  = Hz))

position	7		6		5	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	4.93 s	83.4	4.32 d (3.9)	87.1	2.65 dd (6.4,13.9) 2.20 m	40.3
2		80.0		78.3	2.12 m	38.8
3	5.38 d (4.9)	79.7	5.54 d (4.9)	76.7	5.58 m	74.4
4	3.48 m	46.4	3.61 dd (11.3, 4.8)	45.1	2.97 brs	51.4
5	5.95 s	74.3	5.91 m	73.8	6.13 s	70.1
6		135.8		135.8		145.4
7	5.87 s	65.1	5.89 m	64.6	6.39 s	69.1
8	4.70 d (9.4)	72.5	4.65 d (9.2)	72.7	6.05 s	71.0
9		209.3		209.5	5.07 s	82.4
10		47.9		48.1		41.5
11	3.65 d (2.1)	61.2	3.69 d (2.2)	60.8	4.13 s	77.5
12	3.43 m	58.0	3.33 dd (2.4, 9.4)	59.0		214.0
13	3.26 m	41.6	3.93 m	42.6	2.28 q (6.5)	50.7
14		211.4		204.9		106.3
15		84.8		96.1		90.6
16	1.82 s	19.4	1.81 s	20.2	0.92 d (6.3)	13.3
17	6.31 s 5.91 s	127.9 5.94 brs	6.52 brs 5.94 brs	128.3	5.24 s 5.14 s	106.3
18	1.33 s	21.6	1.34 s	21.6	1.29 s	18.6
19	0.85 s	18.9	0.85 s	19.0	1.14 s	22.1
20	1.66 d (6.4)	19.2	1.52 d (6.4)	17.0	1.30 d (6.5)	9.21
Acetyls						
CO-1		170.6	CO-15		172.4	CO-3, 15
COMe-1	2.13 s	20.3	COMe-15 2.31 s		21.3	COMe- 3,15
CO-3		169.8	CO-3		168.8	CO-5
COMe-3	1.95 s	20.6	COMe-3 1.89 s		20.4	COMe-5 CO-7 COMe-7 CO-9 COMe-9
Benzoyls						
CO-5		164.8			164.9	CO-8
COPh-1		128.3			128.3	COPh-8 1
5	2,6 7.48 m 3,5 6.88 m 4 7.09 m	129.1 127.7 132.6	7.55 m 7.02 m 7.22 m		129.3 127.7 132.8	2,6 8.03 m 3,5 7.42 m 4 7.53 m
CO-7		166.2				166.0
COPh-1		128.6				128.4
7	2,6 7.53 m 3,5 7.02 m 4 7.24 m	129.4 127.9 132.9	7.50 m 6.92 m 7.11 m		129.5 127.8 132.8	
OH-2	2.32 s		OH-2	2.52 s		
OH-8	3.53 d (9.4)		OH-8	3.54 d (9.4)		
OH-15	4.11 s		OH-1	3.92 d (3.9)		

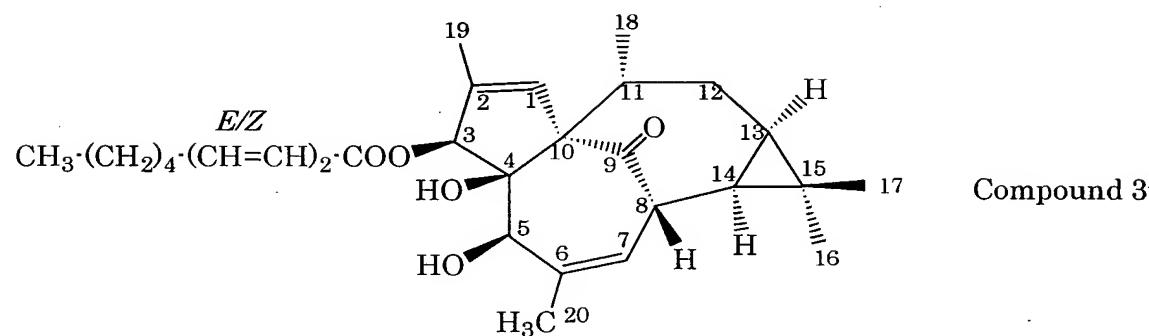
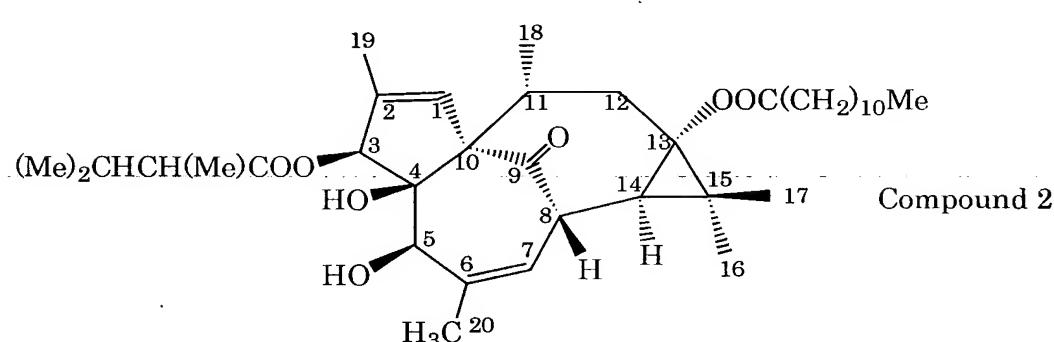
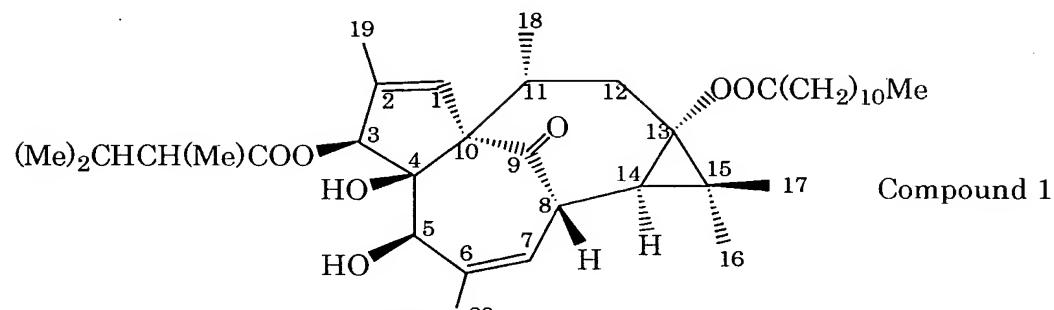
[0016]

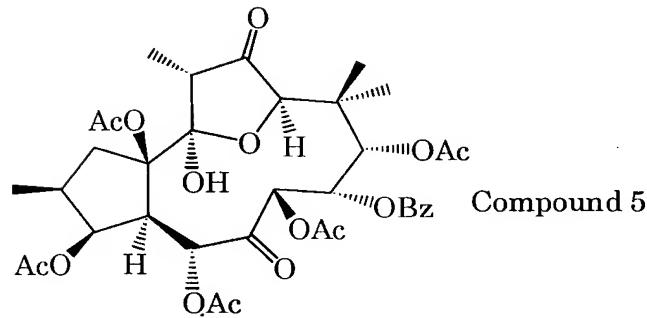
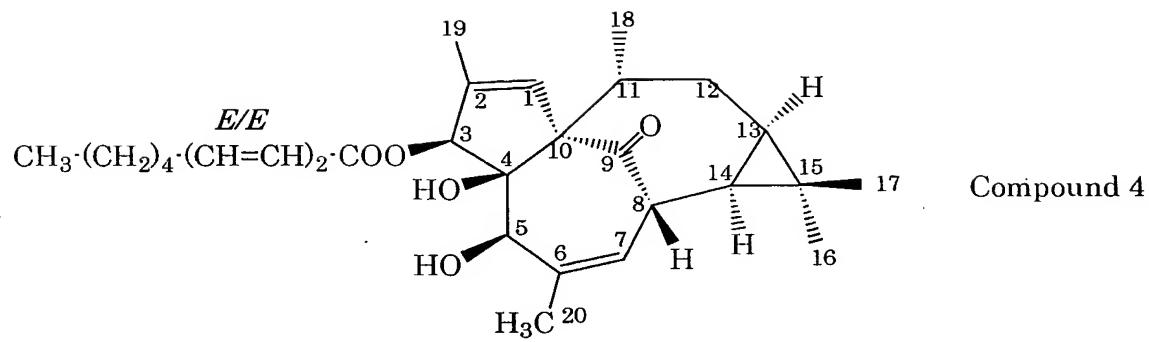
Table 5 NMR Spectral Data of 8 (300 MHz and 75 MHz)

atom	8	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1 $\alpha$	2.68 dd (4.5, 12.0)	39.9
1 $\beta$	2.19 m <sup>b</sup>	
2	2.20 m <sup>b</sup>	38.7
3	5.58 brs	74.1
4	3.05 d (2.7)	51.4
5	6.19 s	69.5
6		144.7
7	6.43 s	69.1
8	6.17 s	71.0
9	5.36 s	83.3
10		41.7
11	4.30 s	77.4
12		213.6
13	2.33 q (6.6)	50.9
14		106.4
15		90.5
16	0.92 d (6.0)	13.2
17a	5.17 s	109.9
17b	4.99 s	
18	1.21 s	22.1
19	1.40 s	18.7
20	1.32 d (6.5)	9.18
3-COMe	2.09 s	169.5
		21.2
5-COMe	1.95 s	168.3
		20.8
7-COMe	1.51 s	170.0
		20.3
15-COMe	2.00 s	168.8
		21.9
8-benzoyl		164.9
		129.7
	8.03 m	129.5
	7.41 m	127.8
	7.55 m	133.1
9-nicotinoyl	9.18 s	162.7
	8.77 d (4.2)	152.7
	8.31 d (7.8)	150.0
	7.39 m <sup>b</sup>	137.4
		125.0
		123.2

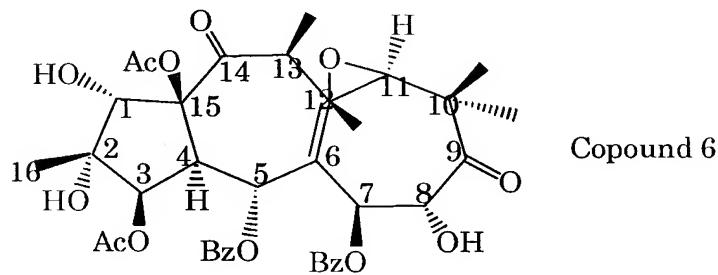
[0017]

Accordingly, the structures of Compounds 1 to 8 were identified from the data above as follows.

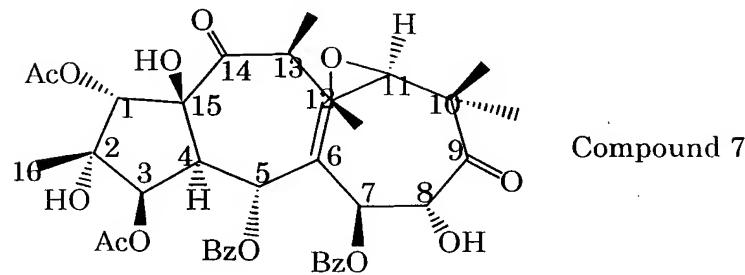




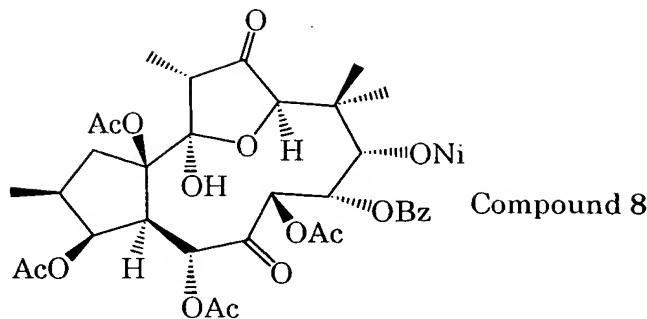
wherein, Ac represents an acetyl radical and Bz represents a benzoyl radical.



wherein, Ac represents an acetyl radical and Bz represents a benzoyl radical.



wherein, Ac represents an acetyl radical and Bz represents a benzoyl radical.



wherein, Ac represents an acetyl radical, Bz represents a benzoyl radical and Ni represents a nicotinoyl radical.

#### [0018]

The compounds of the present invention have an inhibitory activity of cell growth as determined by an animal cap assay described in detail by S. F. Godsave and J. M. W. Slack, in Dev. Biol. 1989, 134: 486-490.

Animal cap cells were dissected from *Xenopus laevis* at the later blastular stage. Single cells were separated from the animal cap cells and transferred to medium to prepare a cell dispersion solution.

The cell dispersion solution was added to a well of a Terasaki plate filled with a 50 % animal medium containing 0.2 mg/ml of gamma-globulin. A solution containing 10 microgram/ml of the compound according to the present invention is added to the well and cultured. Next day, cell division was observed under a microscope. The inhibitory action of the compound tested is expressed a ratio of the number of non-divided cells to the total number of the cells. The results are shown in Table 6.

Table 6 Inhibitory activity of cell division

Compound No.	Inhibitory ratio (%)
Compound 3	53.0 %
Compound 4	55.1 %

The concentration of a compound is 10 microgram/ml.

#### [0019]

Table 6 shows apparently that the compounds of the present invention have an inhibitory activity to cell division, and therefore, they can be useful as a therapeutic agent for treating malignant tumor, such as esophagus cancer, breast cancer, etc.

The active compounds of the present invention may be administered orally, parenterally or subcutaneously. Generally doses may be preferably from 0.1 mg/day/kg to 100 mg/day/kg for adult.

The compounds of the present invention may be administered in various forms, such as tablets, powders, granules, capsules, injections, suppositories, ointments, and cataplasms.

The pharmaceutical composition containing the active compounds of the present invention may be formulated by using conventional carriers and additives such as vehicles such as resolvents, bases, diluents, fillers, adjuvants such as solution adjuvants, emulsifying agents, dispersers, disintegrants, solubilizers, viscosity-increasing agents, and lubricants, and additives such as antioxidants, preservatives, flavoring agents and sweetening agents.

[0020]

[Effect of the invention]

The compounds of the present invention are novel diterpene compounds with antineoplastic activities, and therefore, useful as antineoplastic agents.

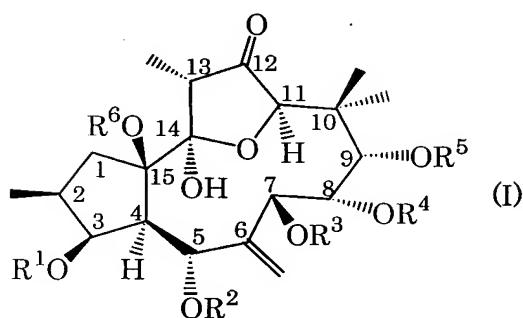
## Abstract

### [Problem to be solved]

The present invention provides a novel diterpene compounds with antineoplastic activities.

### [Means for solving the problem]

The novel diterpene compounds of the present invention are represented by the general formula (I). R<sub>1</sub> to R<sub>6</sub> in the formula represent an aliphatic group, or a radical represented by the general formula RCO<sup>-</sup>, wherein R represents an aliphatic, an aromatic or a heteroaromatic group. The compounds of the present invention may be prepared by extracting roots of Euphorbia kansui L. with an organic solvent such as chloroform, ethyl acetate and butanol. These extracted compounds may be used as starting materials for the preparation of the compounds represented by the general formula (I). The compounds of the present invention have antineoplastic activities, and therefore, useful as antineoplastic agents.



[Chosen drawing] Non.